

Graphene의 최신 연구동향 4

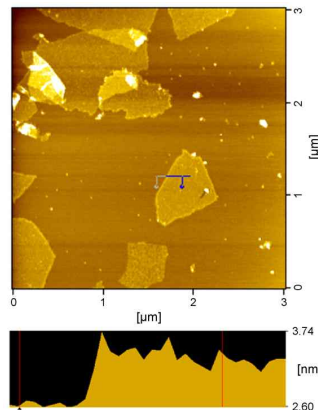
Heavy Metal Ion Sensors

사람이 납, 카드뮴, 은, 수은 등의 중금속에 노출되면 건강에 치명적인 위험을 끼칠 수 있다. 이런 이유 때문에 중금속들의 농도를 검출할 수 있는 감도가 우수하면서도 빠르고 편리하게 분석하는 방법의 필요성이 증가하고 있다[1]. 특히, 중금속 이온의 검출은 환경과 음식의 안정성을 확보하는데 매우 중요하다[2]. 지금까지 보고된 방법들은 atomic absorption or inductively coupled plasma (ICP) atomic emission spectroscopy, ICP-mass spectrometry, electrochemical (EC) techniques 등이다. 그러나 분광학 방법은 복잡한 장치들로 인하여 in-situ로 분석하기는 어렵다. 이에 반하여 전기화학적 방법은 고감도, 저렴한 가격과 편리한 휴대성 등의 장점을 가지기 때문에 in-situ 중금속 농도를 측정하기에 적당하다. 최근에 보고된 graphene 전극을 이용하여 전기화학적 방법으로 중금속 이온 검출 결과와 ssDNA-GO(graphene oxide)을 이용하여 다양한 중금속 이온들을 동시에 검출할 수 있는 시스템에 대하여 살펴보자.

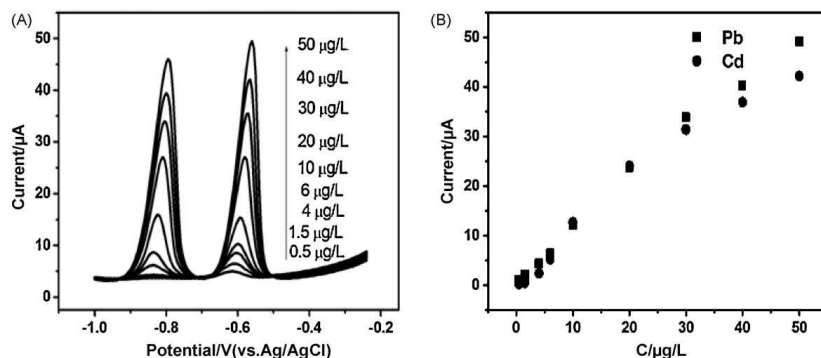
1. Nafion-graphene composite film을 이용한 납과 카드뮴 이온 검출[3]

그래핀 나노시트(nanotsheets)가 1wt.% Nafion-isopropyl-alcohol에 분산된 용액을 in situ plated bismuth film electrode (BME)와 결합하여 전기화학 방법으로 중금속 이온들(Pb^{2+} & Cd^{2+})을 검출할 수 있다. 이렇게 제작된 nafion-graphene(nafion-G) composite film은 differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV)을 측정함으로써 고감도의 센서로 작동하는 것을 확인할 수 있다.

우선 그래핀 나노시트의 구조를 확인하기 위하여 마이카 위에 증착하여 AFM으로 분석한 것이 아래의 그림이다. 나노시트의 한 층의 평균 두께가 1 nm이하임을 알 수 있다. 이러한 나노구조는 전기화학적 방법을 이용하여 이온들을 검출하는데 유리할 것이다.



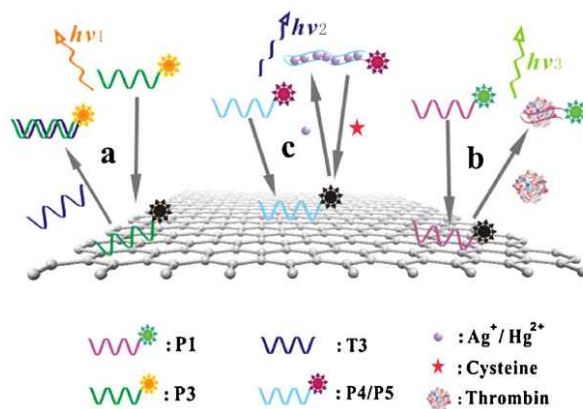
아래 그림은 in situ plated Nafion-G-BFE 전극에서 Pb^{2+} 과 Cd^{2+} 이온의 농도 변화에 따른 stripping current를 보여주고 있다. 이온 검출에 대한 linearity 영역은 Pb^{2+} 은 $0.5 \mu\text{g L}^{-1} \sim 50 \mu\text{g L}^{-1}$ 이고 Cd^{2+} 은 $1.5 \mu\text{g L}^{-1} \sim 30 \mu\text{g L}^{-1}$ 이었다. 또한, 검출한계(S/N = 3)는 두 이온 (Pb^{2+} & Cd^{2+}) 모두 $0.02 \mu\text{g L}^{-1}$ 이다. 이러한 검출한계는 그래핀을 포함하지 않은 Nafion film modified BME와 Nafion/CNT coated BME 전극에 비하여 매우 우수한 결과이다.



이러한 검출한계의 증가는 그래핀의 독특한 특성들(nanosized graphene sheet, nano-scale thickness of these sheets, high conductivity)이 타겟 이온들을 강하게 잡을 수 있는 능력을 증가시키기 때문이다.

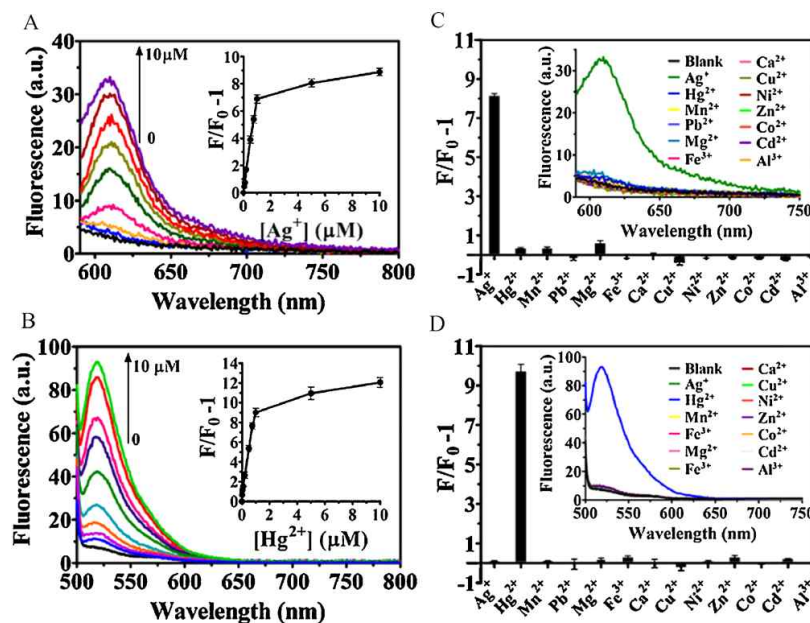
2. ssDNA-graphene oxide (ssDNA-GO)을 이용한 다중 중금속 이온들의 동시검출[4]

Molecular beacons (MBs)은 Tyagi와 Kramer에 의해 1996년 개발된 것으로 태그된 fluorophore (donor)와 quencher (acceptor) 사이의 거리가 가까워짐에 따라 형광세기가 감소한 두 개로 레이블링된 헤파린 구조의 oligonucleotides을 말한다. MBs는 다양한 응용성을 가지고 있지만 다음과 같은 한계를 지니고 있다. 즉, false-positive signals, insufficient sensitivity, high-cost synthesis, difficult selection of dye-quencher pair in certain cases 등이다. 이러한 단점을 극복하고자 산화그래핀(GO)에 MBs를 적용함으로써 위에서 언급된 단점을 극복할 수 있다.

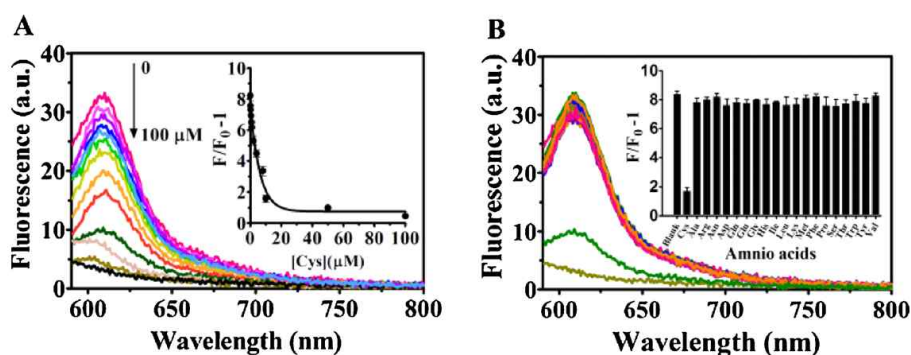


위의 그림은 ssDNA-GO 구조체를 이용하여 다중 타겟 검출을 위한 대략적인 방법을 보여준다. P1, P3, P4/P5는 형광물질이 달린 ssDNA를 나타내고 T3는 P1의 ssDNA와 결합할 수 있는 ssDNA를 나타낸다. 그림 a는 P3 ssDNA가 산화그래핀에 결합되면 형광이 감소한 상태(즉, off)임을 보여준다. 여기에 타겟 DNA, T3을 넣어 주게 되면 DNA hybridization에 의한 결합에 의해 산화그래핀에서 P3 ssDNA가 탈착하면서 형광 세기가 증가한 상태(즉, on)로 변하게 된다. 이러한 원리를 thrombin 검출에 이용된 경우가 그림 b이고 그림 c는 Ag^+ 과 Hg^{2+} 이온의 검출에 적용한 것을 보여주고 있다. 산화 그래핀에 P4/P5 ssDNA가 결합된 상태에서는 형광이 감소했다가 Ag^+ 과 Hg^{2+} 이온을 넣어주면 ssDNA에 들어있는 C-C와 T-T 염기쌍들에 Ag^+ 과 Hg^{2+} 이온들이 결합하여 C- Ag^+ -C 구조체나 T- Hg^{2+} -T 구조체를 형성한다. 이 과정에서 P4/P5 ssDNA가 산화그래핀에서 탈착하면서 형광이 증가하게 된다. 또한, 이렇게 결합된 구조체에 cysteine을 넣어주면 C- Ag^+ -C와 T- Hg^{2+} -T 구조체가 Ag-S 또는 Hg-S 결합에 의해 깨지면서 다시 P4/P5 ssDNA가 산화그래핀에 결합함으로써 형광세기가 감소하게 된다. 즉, 형광세기에 따른 on-off switching과 검출 시스템이 가능해진다.

다음 그림은 P4/P5 ssDNA-GO 구조체를 이용하여 실제 Ag^+ 과 Hg^{2+} 이온을 검출한 결과로써 민감도와 여러 이온들 중에 선택도를 보여준다. 그림 A는 Ag^+ 이온의 농도에 따른 형광 세기의 증가를 볼 수 있는데 검출한계는 약 20 nM이다. 이 결과는 DNAzym 바이오센서 검출한계인 64 nM[5]보다 우수하다. 그림 B는 Hg^{2+} 이온의 결과로 검출한계는 약 5.7 nM로 DNAzyme catalytic beacon의 결과인 2.4 nM[6]에 필적한다. 그림 C, D는 알칼리, 알카라인, 전이금속들(Mn^{2+} , Pb^{2+} , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Al^{3+})이 포함된 혼합 용액 중에서 두 가지 이온들이 매우 선택적으로 검출될 수 있음을 보여주고 있다.



Ag⁺ 이온과 강한 결합력을 가진 cysteine를 검출하기 위하여 ssDNA-GO 구조체를 이용할 수 있다. Ag⁺ 이온은 ssDNA에 존재하는 C-C 염기쌍에 삽입되어 C-Ag⁺-C 결합하여 산화그래핀 전극에서 탈착됨으로써 형광이 증가함으로써 센서로 작동한다. 아래 그림은 Ag⁺ 이온에 대한 P4와 cysteine 사이의 경쟁반응을 이용하여 분석한 결과이다. 그림 A는 P1, P3, P4-GO에 10 μM의 Ag⁺ 이온을 반응시킨 용액에 cysteine 농도를 조절하면서 분석한 것으로 cysteine의 농도가 증가할 때 형광의 크기가 감소하고 있음을 보여준다. 즉, 농도가 증가함에 따라 형광이 off 상태로 변한다. 이는 P4와 결합했던 Ag⁺ 이온이 cysteine 농도가 증가함에 따라 Ag⁺이 cysteine에 결합하여 P4에서 떨어져 나감으로써 P4 ssDNA는 다시 산화그래핀에 증착하여 형광이 세기가 점점 작아지고 있다. 이때의 검출한계는 60 nM로써 다른 색전이 방법들을 이용한 센서들의 검출한계에 필적한다(40 ~ 100 nM). 아미노산 중에서 cysteine의 선택성을 증명하기 위하여 다른 19가지의 특수 아미노산들(10 μM)을 P1/P3/P4-GO에 섞은 10 μM의 Ag⁺ 이온이 포함된 용액에 반응시킨 결과가 그림 B이다. 형광 세기의 감소는 선택적으로 cysteine에서만 일어났다. 즉, 20가지 아미노산 중에서 cysteine만이 선택적으로 검출할 수 있음을 보여준다.



이러한 결과는 산화그래핀(GO)에 MBs를 적용한 platform이 중금속 이온, cysteine, thrombin 등에 다양하게 적용될 수 있는 우수한 시스템을 확인할 수 있다.

References

- [1] Y. Shai, J. Wang, H. Wu, J. Liu, I. A. Aksay, and Y. Lin, "Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review," *Electroanalysis*, 22, 1027, 2010.
- [2] T. Kuila, S. Bose, P. Khanra, A. K. Mishra, N. H. Kim, and J. H. Lee, "Recent advances in graphene-based biosensors," *Biosensors and Bioelectronics*, 26, 4637, 2009.

- [3] J. Li, S. Guo, Y. Zhai, and E. Wang, "High-sensitivity determination of lead and cadmium based on the Nafion-graphene composite film," *Analytica Chimica Acta*, 649, 196, 2009.
- [4] M. Zhang, B. C. Yin, W. Tan, and B. C. Ye, "A versatile graphene-based fluorescence "on/off" switch for multiplex detection of various targets," *Biosens. Bioelectron.*, 26, 3260, 2011.
- [5] X. H. Zhou, D. M. Kong, and H. X. Shen, "Ag⁺ and Cysteine Quantitation Based on G-Quadruplex-Hemin DNAzymes Disruption by Ag⁺," *Anal. Chem.*, 82, 789, 2010.
- [6] J. Liu and Y. Lu, "Rational Design of "Turn-On" Allosteric DNAzyme Catalytic Beacons for Aqueous Mercury Ions with Ultrahigh Sensitivity and Selectivity," *Angew. Chem. Int. Ed.*, 46, 7587, 2007.